

УДК 663.253.41:547.631.4:613.292:612.176

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова,
Г. Б. Кравченко, Н. В. Шишкіна
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНІ ПОКАЗНИКИ ТКАНИН ЩУРІВ В УМОВАХ СТРЕСУ

Одноразове введення адреналіну спричиняє розвиток оксидативного стресу в щурів: підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та зниження антиоксидантних показників. Профілактичне введення поліфенольних екстрактів з насіння винограду двох сортів запобігає порушенню антиоксидантно-прооксидантної рівноваги різною мірою. Обговорюються антиоксидантні властивості досліджених поліфенольних екстрактів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **поліфеноли, продукти перекисного окиснення ліпідів, антиоксиданти.**

ВСТУП. Сучасна людина повсякчас стикається з негативним впливом різних факторів зовнішнього середовища: механічних, фізичних, хімічних, біологічних, психоемоційних та психосоціальних. Незалежно від природи будь-який з них запускає універсальний каскад неспецифічних стрес-реакцій, направлений на відновлення гомеостазу.

На сьогодні відомо, що загальним механізмом пошкодження за дії стрес-чинників є порушення окисно-відновної рівноваги, що виступає первинним медіатором стресу [5]. На першому етапі розвитку стрес-реакції відбувається активація симпатико-адреналової та гіпоталамо-гіпофізо-кортикоадреналової систем, в тому числі підвищене продукування катехоламінів наднирковими залозами. Останні (адреналін, норадреналін) підсилюють забезпечення органів киснем та поживними речовинами. Збільшені рівні жирних кислот, глюкози та кисню неминуче призводять до активації вільнорадикального окиснення, первинними мішенями якого є мембранні ліпіди та ліпопротеїни крові. Крім того, метаболізм катехоламінів реалізується через проміжне утворення радикалів, які також стимулюють перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). Таким чином, оксидативний стрес (зрушення системи антиоксиданти-прооксиданти у бік останніх) є пусковим механізмом, а також наслідком дії стрес-агента.

© А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова, Г. Б. Кравченко, Н. В. Шишкіна, 2011.

Вільні радикали пошкоджують усі біомолекули та призводять до структурних і метаболічних порушень у клітинах із подальшим розвитком патології, некрозу або трансформації. На сьогодні добре відомо, що вільнорадикальні процеси відіграють провідну роль у патогенезі серцево-судинних, онкологічних, запальних, інфекційних, дегенеративних та інших патологій [5, 12]. Тому пошук та дослідження засобів антирадикальної та антиоксидантної протидії є вкрай актуальними.

Антиоксидантні властивості притаманні багатьом природним та синтетичним речовинам. В останні роки неухильно зростає інтерес фармакологів і медиків до рослинного світу як невичерпного джерела оздоровчих та лікувальних засобів. Перевагу засобам рослинного походження віддають через відсутність ризику побічних реакцій, токсичних та алергічних ускладнень, а також звикання при тривалому прийманні. До того ж, у рослинах кожний біологічно активний компонент присутній і діє в комплексі з аналогами, синергістами, стабілізаторами, які взаємно підсилюють та пролонгують ефекти один одного.

Особливу увагу дослідників привертають протекторні властивості винограду культурного. Високий вміст фенольних речовин у плодах цієї рослини (до 70 % усіх фенолів виноградної ягоди міститься в насінні) надає винограду потужних антиоксидантних, антиканцерогенних, антиатерогенних та протизапальних властивостей [10, 11]. Але вплив профі-

лактичного введення поліфенольних екстрактів з насіння винограду на стан антиоксидантно-прооксидантної системи за умов гострого стресу вивчено недостатньо.

У зв'язку з вищевикладеним, метою даної роботи було дослідити вплив попереднього введення поліфенольних екстрактів з кісточок винограду червоного та білого сортів на антиоксидантно-прооксидантні показники у тканинах щурів за умов стресу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконували на безпородних щурах-самцях масою 180–220 г, яких утримували на стандартному раціоні виварію. Стрес викликали шляхом одноразового підшкірного введення адреналіну з розрахунку 2 мг на 100 г маси тіла [4]. Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом через 1 год після ін'єкції. Інтактним щурам вводили відповідний об'єм фізрозчину. Поліфенольні екстракти (ПФЕ) з насіння винограду сортів “Каберне” та “Ркацителі” з метою профілактики стресу та групам контрольних тварин вводили щоденно протягом 14 діб внутрішньошлунково з розрахунку 9 мг на 100 г маси тіла. Екстракти було одержано в Національному інституті винограду і вина “Магарач” (м. Ялта). Дослідження проводили відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Об'єктами дослідження були сироватка крові, гомогенати печінки та нирок.

У вищезазначених тканинах визначали вміст загальних гідроперекисів ліпідів (ЗГ) [1],

дієнових кон'югатів (ДК) [7], ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РП) та ізолюваних подвійних зв'язків (ІПЗ) [1]. Стан антиоксидантної системи тканин оцінювали шляхом вимірювання рівнів аскорбінової кислоти (АК) [1], α -токоферолу (α -Т [9] та відновленого глутатіону (GSH) [6]. В гомогенатах печінки та нирок визначали також активність глутатіонредуктази [3]. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера.

Результати експериментів обробляли статистично, достовірність змін оцінювали за непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Розходження вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з таблиці 1, однократне введення адреналіну спричинило підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (загальних гідроперекисів, дієнових кон'югатів, ТБК-реактивних продуктів) та зниження рівня ізолюваних подвійних зв'язків, які є безпосередніми мішенями для атаки вільними радикалами.

Активнація вільнорадикальних процесів в усіх досліджених тканинах супроводжувалась зменшенням вмісту антиоксидантів (табл. 2), що пов'язано з їх витрачанням в окисно-відновних реакціях, направлених на захист тканин від пошкоджувальної дії радикалів. Крім того, в печінці та нирках відмічали зниження активності глутатіонредуктази (табл. 2), що може бути результатом окисного пошкодження молекул ферменту або зниження концент-

Таблиця 1 – Вплив попереднього введення ПФЕ на вміст загальних гідроперекисів, дієнових кон'югатів, ТБК-реактивних продуктів та ізолюваних подвійних зв'язків у тканинах щурів за умов стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Тканина	Інтакт	Стрес	ПФЕ “Каберне”	ПФЕ “Каберне”+ стрес	ПФЕ “Ркацителі”	ПФЕ “Ркацителі”+ стрес
ЗГ, нмоль/мл (г тканини)	Сироватка	81,37 \pm 9,15	236,42 \pm 21,18*	75,11 \pm 6,17	108,32 \pm 12,14**	78,39 \pm 9,54	121,03 \pm 10,47**
	Печінка	46,32 \pm 2,86	138,01 \pm 6,19*	42,11 \pm 3,95	62,53 \pm 7,89**	40,15 \pm 5,14	78,95 \pm 8,11**
	Нирки	53,17 \pm 6,18	158,45 \pm 19,13*	50,34 \pm 6,17	117,41 \pm 12,37**	52,11 \pm 7,75	129,09 \pm 18,44*
ДК, нмоль/мл (г тканини)	Сироватка	15,76 \pm 2,79	29,61 \pm 3,93*	13,94 \pm 2,43	20,11 \pm 2,15**	14,17 \pm 1,95	23,94 \pm 3,76*
	Печінка	12,35 \pm 1,17	21,17 \pm 2,34*	12,99 \pm 0,99	15,34 \pm 1,95	12,01 \pm 1,95	13,25 \pm 1,11
	Нирки	16,72 \pm 1,49	31,23 \pm 2,44*	15,08 \pm 1,27	18,25 \pm 1,71	15,93 \pm 1,74	25,18 \pm 3,49*
ТБК-РП, нмоль/мл (мг білка)	Сироватка	0,54 \pm 0,09	0,77 \pm 0,08*	0,51 \pm 0,08	0,63 \pm 0,08	0,53 \pm 0,09	0,66 \pm 0,08
	Печінка	0,19 \pm 0,03	0,35 \pm 0,05*	0,15 \pm 0,05	0,24 \pm 0,06	0,17 \pm 0,03	0,28 \pm 0,05*
	Нирки	0,47 \pm 0,07	0,69 \pm 0,08*	0,41 \pm 0,09	0,53 \pm 0,09	0,43 \pm 0,07	0,57 \pm 0,09
ІПЗ, ДЕ/мл (г тканини)	Сироватка	4,95 \pm 1,12	1,9 \pm 0,74*	5,17 \pm 1,32	3,65 \pm 0,97	4,84 \pm 0,87	5,17 \pm 1,95
	Печінка	35,13 \pm 3,19	11,79 \pm 1,54*	33,74 \pm 3,85	27,81 \pm 2,95	36,74 \pm 3,85	23,47 \pm 3,45**
	Нирки	17,94 \pm 2,18	5,98 \pm 0,97*	18,74 \pm 2,11	15,38 \pm 1,45	18,01 \pm 1,27	12,03 \pm 1,27**

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – $p < 0,05$ відносно контролю; ** – $p < 0,05$ відносно стресу.

рації NADPH, необхідного для відновлення глутатіону в глутатіонредуктазній реакції.

Профілактичне введення ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне” значною мірою запобігало накопиченню продуктів ПОЛ у досліджених тканинах (табл. 1). Так, за попереднього введення ПФЕ вміст ЗГ у сироватці та печінці знижувався майже вдвічі порівняно зі стресом. Меншою мірою поліфеноли попереджували підвищення рівня ЗГ у нирках. ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне” зменшував накопичення і ТБК-РП у всіх тканинах, спричинене введенням адреналіну. Вміст ДК у сироватці щурів, які отримували ПФЕ до стресорного впливу, залишався підвищеним порівняно з контролем, але нижчим, ніж у стресованих тварин. А в печінці та нирках попереднє введення ПФЕ нормалізувало рівень ДК. Профілактичне введення ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне” також запобігало зниженню вмісту ІПЗ у печінці та нирках щурів.

Вплив профілактичного введення ПФЕ з кісточок винограду сорту “Ркацителі” на підвищення рівнів продуктів ПОЛ схожий, але в цілому антиоксидантний ефект ПФЕ з насіння цього білого сорту винограду менший (табл. 1). Наприклад, попереднє введення поліфенолів з кісточок винограду сорту “Ркацителі” не впливало на підвищення рівня ДК у нирках, викликане введенням адреналіну.

Встановлений антиоксидантний ефект поліфенольних екстрактів, очевидно, зумовлений здатністю фенольних сполук взаємодіяти як з активними метаболітами кисню, так і з пероксидними радикалами ліпідів, а також пригнічувати активність ферментів, що ге-

нерують активні метаболіти кисню. Крім того, проникаючи у гідрофобну ділянку мембран, поліфеноли значно знижують рухливість ліпідів, що зменшує ефективність взаємодії пероксидних радикалів з новими молекулами. Тобто поліфеноли інгібують процеси ПОЛ як на стадії ініціації, так і на стадії подовження ланцюга [2]. Відомо, що антиоксидантні властивості сполук фенольної природи пов’язані також із захистом аскорбінової кислоти й α -токоферолу від окиснення та відновленням їх окиснених форм [10, 13]. Більше того, фенольні сполуки діють як хелатори металів зі змінною валентністю.

Результати профілактичного введення ПФЕ з кісточок винограду сорту “Каберне” загалом свідчать про нормалізуючий вплив і відносно антиоксидантних показників (табл. 2). Так, поліфеноли запобігали зниженню вмісту відновленого глутатіону в усіх досліджених тканинах, що супроводжувалось та може бути пов’язане з відновленням глутатіонредуктазної активності у печінці та нирках. З іншого боку, фенольні сполуки здатні підвищувати рівень GSH завдяки активації його синтезу через антиоксидант-респонсивний елемент. Попереднє введення ПФЕ з “Каберне” нормалізувало також рівень аскорбінової кислоти та α -токоферолу.

Профілактичне введення поліфенолів з насіння винограду сорту “Ркацителі” так само попереджувало зменшення вмісту відновленого глутатіону та α -токоферолу, але не впливало на зниження активності глутатіонредуктази у нирках і меншою мірою запобігало зниженню рівня аскорбінової кислоти у сироватці стресованих тварин (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив попереднього введення ПФЕ на вміст аскорбінової кислоти, α -токоферолу, відновленого глутатіону та активність глутатіонредуктази у тканинах щурів за умов стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Тканина	Інтакт	Стрес	ПФЕ “Каберне”	ПФЕ “Каберне”+ стрес	ПФЕ “Ркацителі”	ПФЕ “Ркацителі”+ стрес
GSH, мкмоль/мл (г тканини)	Сироватка	13,42 \pm 1,41	8,99 \pm 0,96*	12,96 \pm 1,42	12,85 \pm 1,38	13,97 \pm 1,37	12,03 \pm 2,01
	Печінка	5,3 \pm 0,85	3,53 \pm 0,67*	5,07 \pm 0,69	4,88 \pm 0,42	5,12 \pm 0,83	4,31 \pm 0,64
	Нирки	4,66 \pm 0,37	2,89 \pm 0,31*	5,11 \pm 0,74	4,59 \pm 0,63	4,51 \pm 0,62	4,25 \pm 0,51
ГР, нмоль NADPH/хв/мг білка	Печінка	20,34 \pm 1,19	11,45 \pm 0,99*	22,44 \pm 3,21	18,98 \pm 1,87	19,35 \pm 1,07	16,13 \pm 1,19
	Нирки	12,76 \pm 1,78	8,39 \pm 1,11*	13,41 \pm 0,99	11,56 \pm 1,23	14,04 \pm 1,89	9,93 \pm 1,34*
АК, мкмоль/мл (г тканини)	Сироватка	66,51 \pm 3,01	32,94 \pm 1,6*	69,84 \pm 5,42	55,81 \pm 2,18**	67,12 \pm 3,07	49,64 \pm 3,24**
	Печінка	3,67 \pm 0,41	1,39 \pm 0,22*	3,95 \pm 0,57	3,49 \pm 0,52	3,89 \pm 0,44	3,27 \pm 0,47
	Нирки	8,19 \pm 1,35	5,28 \pm 0,93*	7,99 \pm 0,88	8,05 \pm 0,97	7,57 \pm 0,91	7,36 \pm 0,83
α -Т, нмоль/мл (г тканини)	Сироватка	10,54 \pm 1,17	7,94 \pm 1,16*	12,74 \pm 2,11	9,89 \pm 1,64	11,33 \pm 1,54	8,97 \pm 0,99
	Печінка	29,54 \pm 2,23	12,31 \pm 1,76*	35,19 \pm 4,34	26,07 \pm 2,15	33,14 \pm 3,56	24,15 \pm 2,31
	Нирки	18,37 \pm 1,13	10,31 \pm 1,89*	19,24 \pm 2,11	16,92 \pm 1,78	17,34 \pm 1,85	15,27 \pm 1,89

Отримані нами дані про перевагу поліфенолів із червоного винограду в протекції наслідків стресу узгоджуються з літературними [8]. Більш виражений антиоксидантний вплив ПФЕ з “Каберне”, порівняно з ПФЕ з “Ркацителі”, ймовірно, пов’язаний з вищим вмістом фенольних сполук у ПФЕ з червоного винограду. Зокрема, концентрація дельфінідин-3-О-глікозиду в 54,8 раза, пеонідин-3-О-ацетилглікозиду – в 9,5 раза, мальвідин-3-О-глікозиду – в 3,9 раза, пеонідин-3-О-глікозиду – в 3,3 раза вища у ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне”, ніж у ПФЕ з насіння винограду сорту “Ркацителі”. З літера-

турних джерел відомо, що саме ці сполуки (глікозиди та аглікони дельфінідину, пеонідину, мальвідину, ціанідину, пеларгонідину) відіграють головну роль в антиоксидантній активності продуктів переробки винограду [14].

ВИСНОВОК. Профілактичне введення поліфенолів з насіння винограду запобігає змінам прооксидантно-антиоксидантного балансу, спричиненим одноразовою ін’єкцією адреналіну. Поліфенольний екстракт з кісточок червоного винограду сорту “Каберне” забезпечує більш ефективний антиоксидантний захист.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. – СПб. : ИКФ “Фолиант”, 2000. – 104 с.
2. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К. : Книга плюс, 2006. – 462 с.
3. Герасимов А. М. Ферментативные механизмы торможения перекисного окисления липидов в различных отделах головного мозга / А. М. Герасимов, Л. А. Королева, О. С. Брусов [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 1976. – **22**, № 1. – С. 89–94.
4. Морфологическая характеристика слизистой оболочки желудка и его регионального лимфатического узла при язвенном процессе и лимфотропной коррекции / М. В. Фроликова, В. Н. Горчаков, Л. П. Радченко [и др.] // *Бюллетень СО РАМН.* – 2005. – **115**, № 1. – С. 11–16.
5. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др.]. – М. : Фирма “Слово”, 2006. – 556 с.
6. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // *Методы биохимических исследований* ; под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – С. 183–185.
7. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И. А. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский, Р. И. Лифшиц // *Вопр. мед. химии.* – 1989. – № 1. – С. 127–131.
8. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging / D. de Beer, E. Joubert, W. C. Gelderblom, M. Manley // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – **51**. – P. 902–909.
9. Baoutina A. Macrophages can decrease the level of cholesteryl ester hydroperoxides in low density lipoprotein / A. Baoutina, R. T. Dean, W. Jessup // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, № 3. – P. 1635–1644.
10. Cancer chemoprotective activity of resveratrol, a natural product derived from grapes / M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani [et al.] // *Science.* – 1997. – **275**. – P. 218–220.
11. Determination of peroxy radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator / M. Sano, R. Yoshida, M. Degawa [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – **51**. – P. 2912–2916.
12. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies / U. Forstermann // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2008. – **5**, № 6. – P. 338–349.
13. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine / E. N. Frankel, J. Kanner, B. German [et al.] // *Lancet.* – 1993. – **341**. – P. 454–457.
14. Tsuda T. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by the anthocyanins / Tsuda T. // *FEBS Lett.* – 2000. – **484**, № 3. – P. 207–210.

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красильникова,
А. Б. Кравченко, Н. В. Шишкина
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СЕМЯН ВИНОГРАДА НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

Резюме

Одноразовое введение адреналина вызывает развитие оксидативного стресса у крыс: повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов и снижение антиоксидантных показателей. Профилактическое введение полифенольных экстрактов из семян винограда двух сортов предупреждает нарушение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в разной степени. Обсуждаются антиоксидантные свойства исследованных полифенольных экстрактов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, продукты перекисного окисления липидов, антиоксиданты.

A. L. Zahayko, V. P. Fylymonenko, O. A. Krasilnikova, H. B. Kravchenko, N. V. Shyshkina
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

THE INFLUENCE OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE'S SEEDS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT TISSUES UNDER STRESS

Summary

The single adrenalin causes development of the oxidative stress in rat tissues: the increase of lipid peroxidation products levels and the decrease of antioxidant parameters. Prophylactic introduction by polyphenolic extracts from grape's seeds of two sorts prevents the antioxidant-prooxidant unbalance in a different degree. The antioxidant properties of studied polyphenolic extracts are discussed.

KEY WORDS: polyphenols, lipid peroxidation products, antioxidants.

Отримано 21.04.11

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.